

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**


- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

17  
5/16  
1979  
1981

① BUNDESREPUBLIK ① Offenlegungsschrift ① Int. Cl. 2:  
DEUTSCHLAND ① DE 29 44 138 A 1 G 01 N 35/08

  
DEUTSCHES  
PATENTAMT

② Aktenzeichen  
③ Anmeldetag  
④ Offenlegungstag

P 29 44 138 1 52  
2 11 79  
11 8 81

DE 29 44 138 A 1

⑫ Anmelder  
Technicon GmbH, 8368 Bad Vilbel, DE

⑬ Erfinder  
Assmann, Prof. Dr. med., Gerd. Hoff, Dr. rer. nat.,  
Horst Dietrich, 6600 Münster, DE, Siegm. Dipl.-Chem.  
Dr. rer. nat., Werner, 3618 Uslar, DE, Weber, Dipl. Phys.,  
Rainer, 8368 Niederrieden, DE

Prüfungsentwurf gem. § 44 PatG ist gestellt

⑭ Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen unter Abtrennung von Niederschlägen

DE 29 44 138 A 1

BUNDESDRUCKEREI BEZELIG 68 01 138 0000

Patent  
Reichel  
6/17/79  
1981

TECHNICON

1. Verfa-  
Analysens  
Durchflus  
d a d u r  
daß man d  
tenen ode  
Inkubatio  
führten A  
Probenstr  
durch Abs  
einen all

2. Verfa-  
Lipoprote  
über die  
d a d u r  
daß man a  
aus Phosph  
Density-Li  
ausfällt,  
tion den a  
bleibenden  
und der er

Int. Cl. 7  
G 01 N 35/08

DE 2944138 A1

Dr. R. H. H. H.  
Secker, Dist. Chem.  
1. Weber, Dist. Phys.

Patentanwälte  
Reichel u. Reichel  
8 Frankfurt a. M. 1  
Palmstraße 13

9369

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel 1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, dadurch gekennzeichnet, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstromes absitzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, dadurch gekennzeichnet, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagenzes aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfällt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation den abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

138

- 2 -

2944138

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe leitbaren und für den Durchfluß freigegebenen Zuführungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probenteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Probenzuführungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Fotometer und einem Registriergerät, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und bzw. oder Einschaltung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfällung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungsabschnitten bestehende Sedimentationschlange (6) mit einem Auslaß für den Niederschlag (B) und einem Auslaß für die überstehende Flüssigkeit (A) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationschlange (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzienleitung bis zum Ende der Mischspirale (5, 6) aus einem antiedhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm ausgekleidet ist.

130024/0034

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung  
von Analysen in automatischen Analysensystemen  
unter Abtrennung von Niederschlägen

-----

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem kontinuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten, die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL bzw. VLDL) ausgefällt werden müssen.

Die Hypercholesterämie ist als primärer Risikofaktor für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25 Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit anzusehen.

130024/0034

für  
asch-  
n-  
ter-  
oben-  
lei-  
ange-  
roben-  
spirale  
ergerät,  
  
en-  
enz-  
e (5)  
nd  
de Se-  
eder-  
assig-  
  
s Ver-  
  
Sedi-  
reagens-  
ne Misch-  
n der  
ler Misch-  
abeson-  
gekleidet

ein-  
bes-  
rer  
lic-  
äu-  
in

für  
ell  
kan  
set  
gen  
sti  
vor  
eir  
eir  
tic  
des

ge  
ver  
una  
Pip

1  
ch-

ge-

HDL-Cholesterin läßt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzes bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analyseverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, worin

d eine  
onti-  
taten,  
Verlauf  
eines

ten und  
oppro-  
s, bei  
(LDL

cofaktor  
25  
an der  
aspiro-  
derlich  
bung des  
r Viel-  
- im  
ktor  
Chole-  
e Herz-

verlau  
Prober

erfinc  
einric

fahrer

bedeut

sind  
dungs

D

sigkel  
benach  
und in  
Dichte  
der un-  
Sedime-  
abgesat-  
Nieder-  
tionas  
Teil a  
segmen  
und in  
ausgew

944138

- 5 -

2944138

isch durch  
entwicklung  
t geringe  
Veröffent-  
orwolfram-  
DL-Anteile  
t.

n° der  
ein manu-  
nzes be-  
zusammen-  
nen Res-  
line be-  
teit mit  
Einsatz  
Zugabe  
Inkuba-  
stimmung

e aufwendi-  
Analysen-  
net, daß  
d keine  
sind.

sprüchen  
en Ansprü-

Zeichnun-

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Strömungsverlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten Probenabschnitt.

Fig. 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-einrichtung und

Fig. 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Verfahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluß bei Vermeidung jeglicher Störung des Strömungsverhaltens, wie er gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strömungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüssigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende Niederschlagsreste setzen sich auf einer zweiten Sedimentationsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luftsegmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht und inkubiert, wonach die erhaltene Farbreaktion fotometrisch ausgewertet wird. 130024/0034

D  
Anspruch  
angewand-  
Probenau-  
saugten  
und Inku-  
Absaugen  
ändert s  
rig-fett  
wenn die  
Schluß b-  
Die Best  
Niederac.  
entsprec.

O  
4  
RCC  
CH

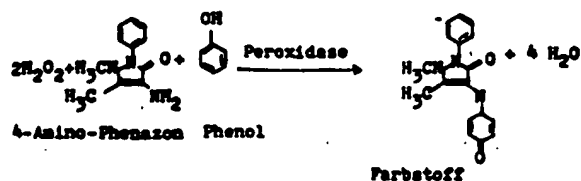
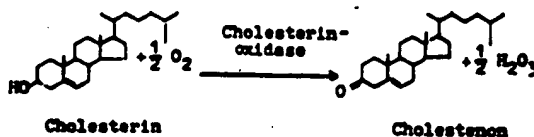
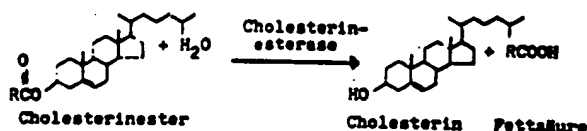
HC

$2H_2O_2 + H_2$   
 $H_2C$   
4-Amino-

- 6 -

2944138

Das allgemeine Verfahren nach Anspruch 1 wird gemäß Anspruch 2 zur automatischen Bestimmung von HDL-Cholesterin angewandt. Das Verfahren verläuft vollautomatisch von der Probenaufnahme bis zur fotometrischen Auswertung. Die angesaugten Proben werden verdünnt, mit Füllungsreagenz versetzt und inkubiert, bevor der Niederschlag nach Sedimentation durch Absaugen entfernt wird. Der Niederschlag der Lipoproteine verändert sich im Verlauf der Inkubation: Anfangs ist er schmierig-fettig und bleibt daher leicht an der Gefäßwandung haften, wenn diese nicht aus antiadhäsivem Material besteht. Zum Schluß besitzt er jedoch eine fast körnige, feste Konsistenz. Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgt in der vom Niederschlag befreiten Lösung nach einer enzymatischen Reaktion entsprechend den folgenden Gleichungen:



**130024/0034**

gemäß  
einer  
heit  
teren  
hält  
Küve  
Eink  
fitt  
adhm  
(PTF  
gekl  
zu v

Bois

stoff  
befi  
Darw  
eine  
fluss  
vera  
den.

nehme  
Über  
einer  
Luft:  
(1,0  
ethy  
Luft  
setz



Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 5 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 3, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationschlange 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflußfotometer 3 mit einer Küvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationsschlange 5 aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff ausgekleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

#### Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennehmers 1 befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Zwischenschaltung von Waschflüssigkeitsabschnitten in einem derartigen Rhythmus angesaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Entnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennehmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über den in der Pumpe 2 installierten Probenschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Fällungsreagens mit Netzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Fällungsreagens ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %  
6,25 mM  
20 mM  
pH 7,1  
5 ml Po

Nach d:  
25 Windungen  
schlange 6:  
schlag 8 wie  
Überstand w  
Flüssigkeit  
Luft segmen  
der in eine  
optische Di  
Probe entst  
gemessen. 7

Wa/Cu

8

- 8 -

2944138

0,5 % Phosphorwolframsäure  
6,25 mM Magnesiumchlorid  
20 mM Natriumhydroxid  
pH 7,1  
5 ml Polyoxyethylenlauryläther (Brij 35) pro 1000 ml

Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations-  
schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Nieder-  
schlag B wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem  
Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der  
Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit  
Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zugesetzt,  
der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die  
optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der  
Probe entstehenden Farbstoffes wird im Durchflußfotometer 3  
gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

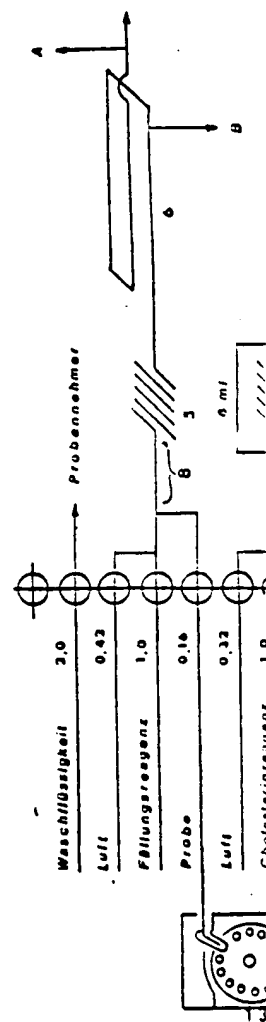
Va/Oa

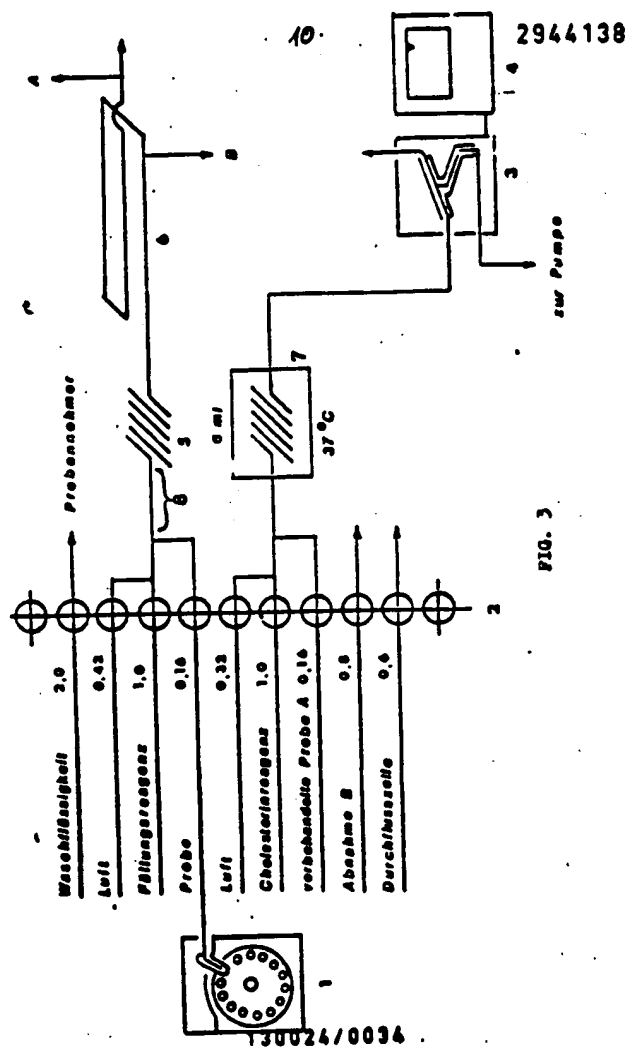
130024/0034

**DERWENT PUBLICATIONS LTD.**

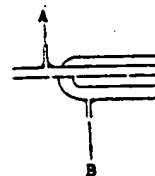
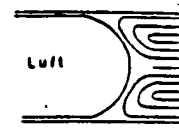
DERWENT PUBL

. 9.  
Leerseite





**FIG. 3**



DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DEI

4138

2944138

Nummer:  
Int. CL. P:  
Anmeldungs-  
Ordnungsnummer:

29 44 138  
G 01 G 25/00  
2. November 1970  
11. Juni 1981

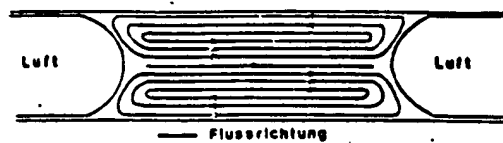


FIG. 1

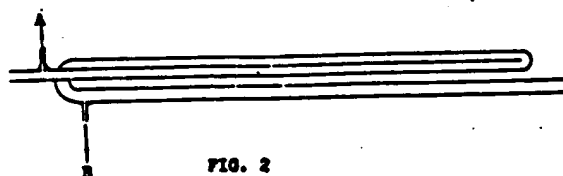


FIG. 2

130024/0034

SUNDERI  
DEUTSCH



DEUTSCH  
PATENT

Anmelder:  
AGS Austria  
Gesellschaft für  
DE

Verfahren in